昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, February 2012, 55(2): 247 – 254 ISSN 0454-6296

湖南三地区麦氏安瘿蜂体内 *Wolbachia* 的感染及其 *wsp* 基因序列分析

杨筱慧[1]，朱道弘[1,2,*]，刘志伟[3]，赵 玲[1]

（1. 中南林业科技大学昆虫行为与进化生态学实验室，长沙 410004；2. 湖南第一师范学院动物学实验室，长沙 410205；
3. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920, USA）

摘要：为检测麦氏安瘿蜂 *Andricus mairei* Kieffer 有无 *Wolbachia* 感染，本研究对其岳阳、长沙和邵阳 3 种群雌、雄成虫体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行了 PCR 检测，进而对获得的基因片段进行了序列分析。结果显示，麦氏安瘿蜂岳阳、长沙及邵阳种群雌、雄成虫均有 *Wolbachia* 感染，除邵阳种群雌成虫的感染率为 80% 之外，其他均为 100%。3 个种群 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列长度皆为 561 bp，且序列完全一致。麦氏安瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与已知瘿蜂族（Cynipini）*Neuroterus macropterus*、*Biorhiza pallida* 及 *Andricus solitarius*（strain 1）以及 Synergini 族 *Synergus crassicornis* 感染的 *Wolbachia* 的一致性达 95%。除 Synergini 族 *Ceroptres cerri* 感染的 *Wolbachia* 属于 B 群（B group）之外，瘿蜂感染的 *Wolbachia* 均属于 A 群（A group）。在 NJ 系统树中，麦氏安瘿蜂与瘿蜂族 *Neuroterus macropterus*、*Biorhiza pallida* 和 *Andricus solitarius*（strain 1）及 Synergini 族 *Synergus crassicornis* 感染的 *Wolbachia* 聚合在同一分支。此外，麦氏安瘿蜂岳阳、长沙和邵阳种群均获得了雌、雄成虫，其雌性率分别为 15.3%，12.1% 和 19.8%，表现出明显的雄性比偏高。结果提示与瘿蜂族的其他已报道的种类一样，*Wolbachia* 与麦氏安瘿蜂的共生并不诱导其营产雌孤雌生殖。

关键词：瘿蜂；麦氏安瘿蜂；*Wolbachia*；*wsp* 基因；系统发育关系

中图分类号：Q968 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)02-0247-08

Sequencing and phylogenetic analysis of the *wsp* gene of *Wolbachia* in three geographic populations of an oak gall wasp, *Andricus mairei* (Hymenoptera: Cynipidae), from Hunan, South China

YANG Xiao-Hui[1], ZHU Dao-Hong[1,2,*], LIU Zhi-Wei[3], ZHAO Ling[1] (1. Laboratory of Insect Behavior and Evolutionary Ecology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. Laboratory of Zoology, Hunan First Normal University, Changsha 410205, China; 3. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920, USA)

Abstract: To understand the effects of *Wolbachia* in *Andricus mairei* Kieffer, an oak gall wasp (Cynipini, Cynipidae) that forms clusters of up to 30 monothalamous galls in the catkins of *Quercus glandulifera* var. *brevipetiolata* Nakai, we examined the presence and infection frequency of *Wolbachia* in three widely separated geographic populations of *A. mairei* in Hunan Province, South China, using polymerase chain reaction and sequence determination of the *wsp* gene of *Wolbachia* from the three populations. Our survey results showed that *Wolbachia* infection rates were unusually high in the three test populations: 100% for the male wasps from all populations, while 100%, 100% and 80% for the Yueyang, Changsha and Shaoyang populations of the female wasps, respectively. The sequencing results showed that the gene from all the three populations is 561 bp in length. Comparison with the *wsp* gene sequences in *A. mairei* and *Neuroterus macropterus*, *Biorhiza pallida*, *Andricus solitarius* (strain 1) and *Synergus crassicornis* revealed a 95% identity. The phylogenic relationship of *Wolbachia* strains in Cynipidae with the known *wsp* sequences indicated that the *Wolbachia* strain of *A. mairei* is closely related to that of *N. macropterus*, *B. pallida*, *A. solitarius* (strain 1), and *S. crassicornis*, and belongs to the A group. We also discovered strikingly male-biased sex ratios in all the test populations: females only accounted for 15.3%, 12.1%, and 19.8% of the Yueyang, Changsha, and Shaoyang populations,

基金项目：国家自然科学基金项目(30872036)

作者简介：杨筱慧，男，1981 年生，湖南邵阳人，博士研究生，主要从事昆虫行为与进化生态学的研究，E-mail：poplarbright@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：daohongzhuja@yahoo.com.cn

收稿日期 Received：2011-10-24；接受日期 Accepted：2012-01-17

respectively, indicating the extremely male-biased sex ratios. These results suggest that the symbiosis of *Wolbachia* with *A. mairei* does not induce parthenogenesis in *A. mairei*, which can not be properly explained and is worth further investigation.

Key words: Gall wasp; *Andricus mairei*; *Wolbachia*; *wsp* gene; phylogenetic relationship

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一类以节肢动物及线虫等为宿主的细胞质共生细菌，属于变形菌门(Proteobacteria)的 α 亚门的立克次氏体目(Rickettsiales)，为革兰氏阴性细菌(Werren, 1997; Stouthamer *et al*., 1999; Weinbauer *et al*., 2004)。该菌的传播方式主要为种内的垂直传播，即宿主雌性个体感染的细菌经卵细胞的细胞质传递给子代(Werren, 1997)。但在一些昆虫种类中，也存在水平传播现象(Vavre *et al*., 1999)。*Wolbachia* 能对被感染昆虫等节肢动物的生殖方式进行调控，包括诱导宿主胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility)、诱导孤雌生殖(parthenogenesis-inducing)、诱导雌性化(feminizing)及雄性致死(male-killing)(O'Neill *et al*., 1997; Werren, 1997; Ngi-Song *et al*., 1998)。感染 *Wolbachia* 的昆虫种类估计超过 17%(Werren *et al*., 1995; West *et al*., 1998; Werren and Windsor, 2000)，一些学者甚至推测感染昆虫的种类可能达到 76%，因此，*Wolbachia* 被认为是自然界分布最广、丰度最大的共生菌(Jeyaprakash and Hoy, 2000)。在膜翅目中，如姬蜂科(Ichneumonidae)(Leach *et al*., 2004)、茧蜂科(Braconidae)(Rincon *et al*., 2006)、赤眼蜂科(Trichogrammatidae)(钟敏和沈佐锐, 2004)、金小蜂科(Pteromalidae)(Stouthamer and Kazmer, 1994)、蚜小蜂科(Aphelinidae)(Lo Verde *et al*., 2008)、跳小蜂科(Encyrtidae)(Pijls *et al*., 1996)、蚁科(Formicidae)(Bouwma *et al*., 2006)及蜜蜂科(Apidae)(Hoy *et al*., 2003)等类群的昆虫均有 *Wolbachia* 共生的报道，尤其是寄生蜂中的感染率更是高于其他昆虫类群(Werren *et al*., 1995;)。瘿蜂科为瘿蜂总科(Cynipoidea)中的植食性类群，一般于为害部位形成虫瘿，已知种类约 1 400 种，被划分为两个亚科，即 Hodiernocynipinae(均为化石种)和瘿蜂亚科(Cynipinae)(现存种和个别化石种)，而瘿蜂亚科包含 6 个族(tribe)，即 Aylacini 族、Eschatocerin 族、Diplolepidini 族、Synergini 族、Pediaspidili 族及 Cynipini 族(Liljeblad and Ronquist, 1998; Ronquist, 1999a)。已证实 Aylacini 族、Diplolepidini 族、Synergini 族及 Cynipini 族的部分种类有 *Wolbachia* 的感染(Plantard *et al*., 1999; Abe and Miura, 2002; Rokas *et al*., 2002; Zhu *et al*., 2007)。瘿蜂具有多种繁殖方式，Aylacini 族、Eschatocerini 族、Diplolepidini 族和 Synergini 族主要进行产雄孤雌生殖(arrhenotoky)(未受精卵发育为雄性个体)，在 Aylacini 族和 Diplolepidini 族中亦有一些种类进行产雌孤雌生殖(thelyotoky); Pediaspidili 族和 Cynipini 族主要营周期性的孤雌生殖(cyclical parthenogenesis)(孤雌生殖世代与两性生殖世代交替发生)，也有一些种类营产雌孤雌生殖(Askew, 1984; Liljeblad and Ronquist, 1998; Ronquist, 1999b; Atkinson *et al*., 2002; Stone *et al*., 2002)。最近的一些研究证实，Aylacini 族和 Diplolepidini 族一些产雌孤雌生殖种类的孤雌生殖与 *Wolbachia* 密切相关(Plantard *et al*., 1998, 1999)。对于 Cynipini 族的产雌孤雌生殖，Abe(1986)及 Stone 等(2002)认为可能与 *Wolbachia* 的共生有关，因 *Wolbachia* 的影响，而导致周期性孤雌生殖中两性生殖世代的缺失。然而，虽然已发现 *Andricus mukaigawae*(Abe and Miura, 2002)和栗瘿蜂 *Dryocosmus kuriphilus*(Zhu *et al*., 2007)等 Cynipini 族昆虫存在 *Wolbachia* 的共生，但研究结果均表明 *Wolbachia* 的共生与宿主的产雌孤雌生殖无关。

麦氏安瘿蜂 *Andricus mairei* Kieffer 属瘿蜂亚科瘿蜂族(Cynipini)，寄主为短柄枹栎 *Quercus glandulifera* var. *brevipetiolata* Nakai，于春季在寄主的枝条上形成虫瘿。Kieffer(1906)依据采自中国贵州的雄性成虫将本种定名为麦氏拟安瘿蜂 *Parandricus mairei* Kieffer(Dalla Torre and Kieffer, 1910)。Melika 和 Abrahamson(2002)在厘定瘿蜂族的属级分类时，认为拟安瘿蜂属 *Parandricus* Kieffer(1906)应为安瘿蜂属 *Andricus* Hartig(1840)的新异名。安瘿蜂属已知 300 余种(Abe *et al*., 2007)，在栎属植物的几乎所有器官上形成形状多样的虫瘿(Stone and Cook, 1998; Melika and Abrahamson, 2002)。麦氏安瘿蜂与最近记述的在柞栎 *Q. dentata* 叶上形成虫瘿的台湾安瘿蜂 *A. formosanus*(Tang *et al*., 2009)是安瘿蜂属已知种中仅有的产自东洋区的两个种。本研究在湖南岳阳、

长沙及邵阳采集了麦氏安瘿蜂虫瘿，并获得羽化成虫。利用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异引物，通过 PCR 法扩增了其基因片段，测定了目的基因片段的 DNA 序列，证实了麦氏安瘿蜂体内 *Wolbachia* 的共生。通过与已知瘿蜂科中其他种类 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性比对，构建了系统发育树，确定了其 *Wolbachia* 的进化地位，为进一步研究 *Wolbachia* 对麦氏安瘿蜂生殖的影响提供了基础。

1　材料与方法

1.1　样本采集

麦氏安瘿蜂的虫瘿于 2011 年 5 月采自湖南岳阳、长沙和邵阳（表 1），寄主植物均为短柄枹栎 *Quercus glandulifera* var. *brevipetiolata* Nakai。采集的虫瘿于室温条件下置于养虫笼内保存，5 月中、下旬瘿蜂成虫羽化。获得的羽化成虫以无水乙醇浸泡，保存于 –40℃的低温冰柜备用。

1.2　总 DNA 的提取

取麦氏安瘿蜂 3 种群雄成虫各 20 头个体、雌成虫各 10 头个体，以超纯水洗涤，然后以个体为单位分别将其置于装有 100 μL STE 缓冲液（100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH 8.0）的 1.5 mL 离心管内，将其捣碎后加入 10 μL 10% 的 SDS 试剂及蛋白酶 K（20 mg/mL）2 μL，旋转混匀后 37℃过夜。再加 100 μL 的 PCL［苯酚∶氯仿∶异戊醇 = 25∶24∶1（v∶v∶v）］抽提，5 000 r/min 离心 10 min，取上清液，加 100 μL PCL 再次抽提，5 000 r/min 离心 10 min，取上清液，加 10 μL 醋酸钠（3 mol/L）和 250 μL 无水乙醇于 –20℃过夜。5℃ 14 000 r/min 离心 20 min，弃上清液。再加 75% 冷乙醇洗涤，5℃ 14 000 r/min 离心 20 min，弃上清液，干燥后加 50 μL TE 缓冲液溶解，–4℃保存。

1.3　*Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的 PCR 扩增及检测

Wolbachia 的 *wsp* 基因片段的特异引物为 *wsp*81F（5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′）和 *wsp*691R（5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′）（Zhou *et al*., 1998）。PCR 扩增体系为 25 μL，包括 18 μL H_2O，1 μL 模板 DNA，2.5 μL 10 × buffer，1 μL dNTPs（2.5 mmol/L），上游和下游引物（10（mol/L）各 1 μL，1 μL Taq DNA 聚合酶（2.0 U/μL）。扩增条件为 95℃预变性 3 min，95℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 1 min，共 35 个循环，循环结束后 72℃延伸 7 min。

取 PCR 扩增产物 5 μL 点样于 1.0% 的琼脂糖凝胶，然后置于 0.5 × TBE 缓冲液中电泳，电压为 70 V，电泳时间约 45 min。电泳后以溴化乙锭染色，凝胶成像系统检测其基因条带的有无。DNA 分子量标准物为 D2000 Marker（上海天根生物公司），以栗瘿蜂 *Wolbachia* 为阳性对照（Zhu *et al*., 2007），纯净水为阴性对照。

1.4　*Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段序列测定及分析

将目的基因片段的 PCR 产物回收、纯化，然后与 pMD18-T 载体连接，再转化到感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* 中，筛选阳性克隆，随机挑选 3 个克隆，委托北京华大基因有限公司进行双向测序。各种群测序 3 头个体，以其一致序列为准。

从 NCBI 网站下载瘿蜂科昆虫 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列，并利用 Blast 工具进行一致性比较。使用 Clustal X 2.0 软件将本研究获得的序列以及 GenBank 中其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行序列完全排列。由于碱基位点第 74 ~ 111，214 ~ 252 和 518 ~ 584 位 3 个区域的核苷酸同源性存在歧义，参照 Braig 等（1998）及 Rokas 等（2002），在后续的分析中排除了这 3 个区域。使用软件 Model-Test 3.7对进化模型组合进行筛选，依据 AIC（Akaike Information Criterion）标准，确定 AIC 值最小的模型为最优进化模型。将排列好的基因序列数据输入 PAUP 4.0 软件，先用最大似然法（maximum likelihood，ML）计算遗传距离，然后根据 Model-Test 3.7 最优进化模型的 Lset 值设置相关参数，进行 1 000次自导复制（bootstrap replication），用最大似然法构建 ML 系统树。同时，将排列好的基因序列数据输入 MEGA 5.0 软件，根据 Kimura's 2-parameter 模型计算遗传距离，依据 Model-Test 3.7 最优进化模型设定 Gamma 参数，进行 1 000 次自导复制，使用邻位相连法（neighbor-joining method）构建 NJ 系统树。

2　结果与分析

2.1 麦氏安瘿蜂的虫瘿及雌雄性比

麦氏安瘿蜂的生物学所知甚少，文献仅记载其寄主为栎属，于 5 月中旬羽化，分布地包括贵州和汉口。我们最近几年来在湖南岳阳、长沙、株洲及邵阳均有采到，表明其分布较为广泛，至少包括湖

南、贵州和湖北三省。其寄主为短柄枹栎 *Quercus glandulifera* var. *brevipetiolata* Nakai，在寄主的柔荑花序上于春季形成簇状单室虫瘿(图 1)。每瘿簇含 30 个以上的虫室，岳阳、长沙和邵阳种群虫瘿的虫室数分别为 39.3 ±7.7 (mean ± *SD*, n =3)、36.6 ± 2.7 (n =5)和 33.3 ±6.7 (n =4)。在湖南于 5 月上旬采集到的虫瘿，于 5 月中、下旬羽化为成虫。岳阳、长沙和邵阳种群的雌性率分别为 15.3%，12.1% 和 19.8% (表 1)，均表现出明显的雄性比偏高。

表 1 麦氏安瘿蜂样本的采集信息、雌雄性比及 *Wolbachia* 的感染率

Table 1 Collecting data, sex ratios, and *Wolbachia* infection rates in *Andricus mairei* populations sampled

种群代码 Population Code	采集地 Collecting locality	纬度(°N) Latitude	经度(°E) Longitude	采集时间 Collecting date (year-month-day)	虫瘿数 Number of galls	雌:雄 Female:male	感染率(%) Infection rate
YY	湖南岳阳 Yueyang, Hunan	29.22	113.06	2011-5-15	3	13:72 (15.3%)[†]	100 (♀) (10)[§] 100 (♂) (20)
CS	湖南长沙 Changsha, Hunan	28.12	112.59	2011-5-06	5	20:145 (12.1%)	100 (♀) (10) 100 (♂) (20)
SY	湖南邵阳 Shaoyang, Hunan	27.14	111.28	2011-5-12	4	16:65 (19.8%)	80 (♀) (10) 100 (♂) (20)

[†]指雌性率 Percentage of females; [§]括号内数字指 PCR 检测昆虫数 Numbers in parentheses indicate the number of insects tested in PCR.

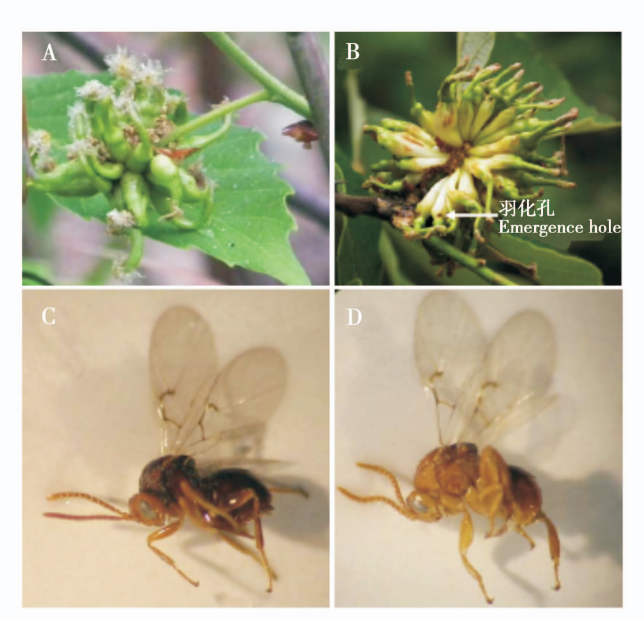


图 1 麦氏安瘿蜂的虫瘿及成虫

Fig. 1 The gall and adult of *Andricus mairei* on *Quercus glandulifera* var. *brevipetiolata*

A: 发育中的虫瘿 Young gall; B: 成熟虫瘿 Mature gall; C: 雌成虫 Female adult; D: 雄成虫 Male adult.

2.2 麦氏安瘿蜂中 *Wolbachia* 感染率

使用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的特异引物 81F 和 691R，分别对麦氏安瘿蜂 3 种群雌成虫 10 头个体、雄成虫 20 头个体进行了 PCR 检测，均获得了长度约为 600 bp 的基因片段，证实了 *Wolbachia* 在麦氏安瘿蜂体内的感染。序列分析的结果显示，岳阳、长沙及邵阳种群 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列长度均为 561 bp，且序列完全一致，已提交 GenBank 注册，登录号为 JN710456。3 个种群的雌、雄成虫中，除岳阳种群雌成虫的感染率为 80% 之外，其他均为 100% (表 1，图 2)。

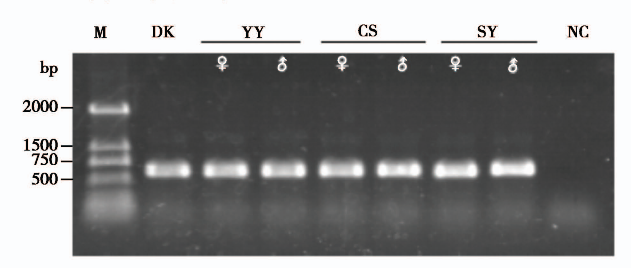


图 2 麦氏安瘿蜂岳阳(YY)、长沙(CS)、邵阳(SY)种群 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的 PCR 扩增

Fig. 2 The PCR amplification of the *wsp* gene fragment of *Wolbachia* in Yueyang (YY), Changsha (CS) and Shaoyang (SY) populations of *Andricus mairei*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; DK: 栗瘿蜂 *Dryocosmus kuriphilus*; NC: 阴性对照(水) Negative control (water).

2.3 麦氏安瘿蜂与已知瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性

使用 NCBI 网站的 Blast 工具，对麦氏安瘿蜂、GenBank 已登录的瘿蜂及其他代表性昆虫种类的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列进行了一致性分析(表

2）。麦氏安瘿蜂岳阳、长沙及邵阳种群 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列完全一致，与其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性介于 80%～95% 之间；与 Cynipini 族的 *Neuroterus macropterus*，*Biorhiza pallida* 和 *Andricus solitarius*（strain 1）以及 Synergini 族的 *Synergus crassicornis* 感染的 *Wolbachia* 的序列一致性最高，为 95%；与 Synergini 族的 *Ceroptres cerri* 的一致性最低，仅为 80%。

表 2　麦氏安瘿蜂与已知瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性比较

Table 2　Sequence identity of the *wsp* gene of *Wolbachia* from *Andricus mairei* with other species of Cynipidae

寄主昆虫 Host insects	核苷酸数目 Number of nucleotides	序列一致性(%) Sequence identity	寄主繁殖模式 Reproductive mode of host	GenBank 登录号 GenBank accession no.	参考文献 References
Andricus mairei	561	–	*	JN710456	–
Callirhytis glandium	594	94	CP	AY095156	Rokas *et al*., 2002
Synergus gallaepomiformis	588	94	A	AY095155	Rokas *et al*., 2002
Andricus solitarius strain 1	564	95	CP	AY095153	Rokas *et al*., 2002
Biorhiza pallida	564	95	CP	AF339629	Rokas *et al*., 2002
Neuroterus macropterus	564	95	T	AY095152	Rokas *et al*., 2002
Synergus crassicornis	564	95	A	AY095154	Rokas *et al*., 2002
Andricus solitarius strain 2	573	83	CP	AY095151	Rokas *et al*., 2002
A. solitarius strain 3	576	83	CP	AY095150	Rokas *et al*., 2002
Synergus diaphanus	576	83	A	AY095148	Rokas *et al*., 2002
Synergus reinhardi	576	83	A	AY095147	Rokas *et al*., 2002
Synergus umbraculus	576	83	A	AY095149	Rokas *et al*., 2002
Plagiotrochus quercusilicis	546	82	T	AY095158	Rokas *et al*., 2002
Dryocosmus kuriphilus	573	85	T	DQ493720	Zhu *et al*., 2007
Ceroptres cerri	540	80	A	AY095157	Rokas *et al*., 2002

CP：周期性孤雌生殖 Cylic parthenogenesis；A：产雄孤雌生殖 Arrhenotoky；T：产雌孤雌生殖 Thelytoky；*：当代为产雄孤雌生殖，是否为周期性孤雌生殖有待研究 Not known whether there exists CP.

使用 MEGA 软件用 NJ 方法和使用 PAUP 软件用 ML 方法分别构建了系统发育树。获得的 NJ 和 ML 系统树除一些小的分支存在细微差异之外，二者基本一致，故而本研究仅给出了 NJ 系统树（图 3）。自图 4 的 NJ 系统树可知，除 Synergini 族的 *Ceroptres cerri* 属于 B 群（B group）之外，瘿蜂感染的 *Wolbachia* 均属于 A 群（A group）。麦氏安瘿蜂与 Cynipini 族 *N. macropterus*、*B. pallida* 和 *A. solitarius*（strain 1）及 Synergini 族 *S. crassicornis* 感染的 *Wolbachia* 聚合在同一分支。

3　讨论

本研究通过 *Wolbachia* 外膜蛋白基因 *wsp* 的 PCR 扩增及序列分析证实了麦氏安瘿蜂岳阳、长沙及邵阳种群雌、雄成虫均存在 *Wolbachia* 的感染，除邵阳种群雌成虫的感染率为 80% 之外，其他均为 100%，且所测 *wsp* 基因序列完全一致。基于 *wsp* 基因部分序列构建了其系统发育树，麦氏安瘿蜂 *Wolbachia* 属于 A 群，与 Cynipini 族的 *N. macropterus*，*B. pallida* 和 *A. solitarius*（strain 1）以及 Synergini 族的 *S. crassicornis* 感染的 *Wolbachia* 聚合在同一分支。

瘿蜂亚科瘿蜂族昆虫在栎属、栗属等壳斗科植物上形成各种形态的虫瘿，已知种类约 1 000 种，分属 26 属，主要营周期性孤雌生殖（cyclical parthenogenesis）或称世代交替（heterogony），即有性世代和无性世代交替发生（Askew，1984；Ronquist，1999a，1999b；Pujade-Villar *et al*.，2001；Stone *et al*.，2002）。除瘿蜂外，还有双翅目的瘿蚊、同翅目

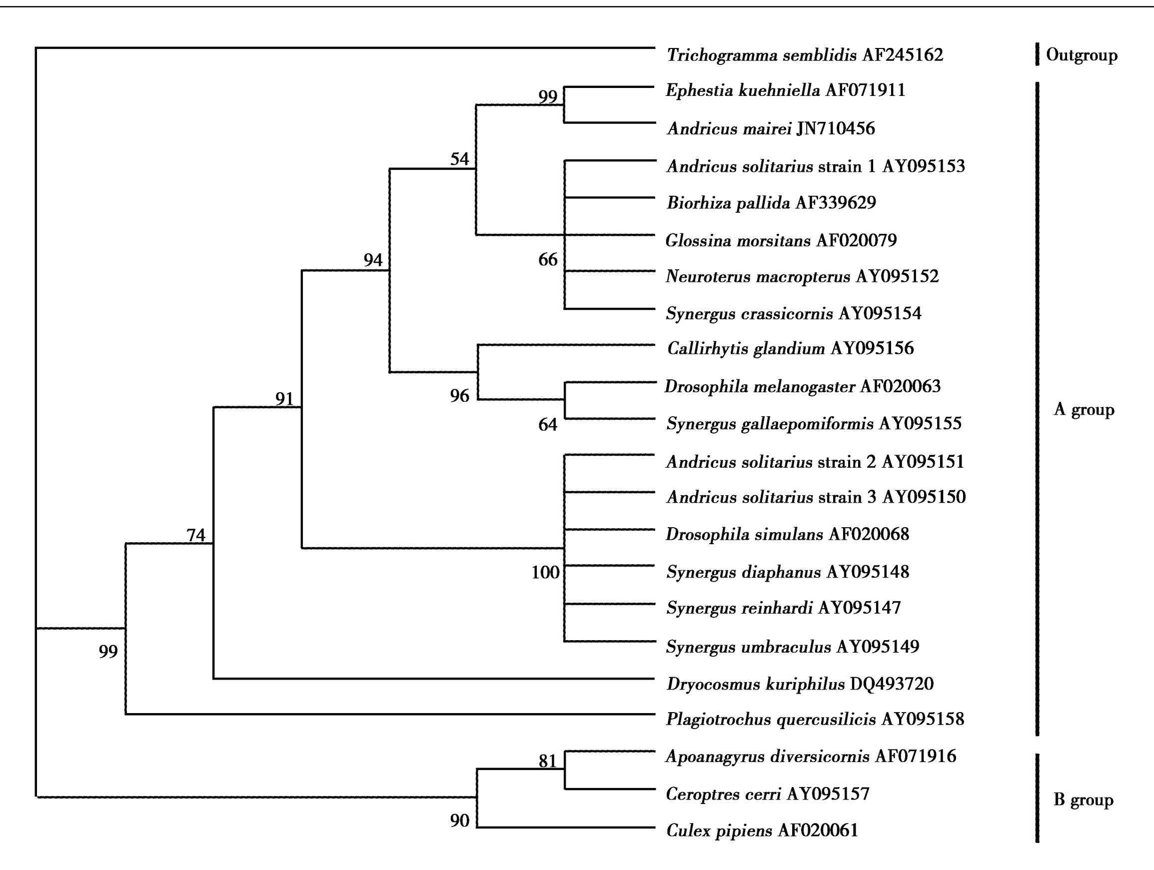


图 3 麦氏安瘿蜂与其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的系统进化关系

Fig. 3 Phylogenetic relationship of *wsp* gene sequences of *Wolbachia* in *Andricus mairei* and other gall wasps

分支间的数字指基于 1 000 次自导复制的 bootstrap 值；黑体示瘿蜂种类。Numbers above branches are bootstrap values computed from 1 000 replications. Host species in bold are gall wasps.

的蚜虫及鞘翅目的少量甲虫等昆虫类群营周期性孤雌生殖(Hebert, 1987; Suomalainen *et al.*, 1987)。与其他营周期性孤雌生殖昆虫类群(如蚜虫类)不同的是，瘿蜂族昆虫有性世代和无性世代严格地交替进行，通常 1 年只发生 1 个世代，尽管也有例外的存在，即一些种类 1 年内完成有性—无性繁殖周期，1 年发生 2 代(Askew, 1984)。但是，也有一些瘿蜂族的种类仅有无性世代，进行产雌孤雌生殖(Liljeblad and Ronquist, 1998; Ronquist, 1999a)。Abe(1986)及 Stone 等(2002)推测这些种类的产雌孤雌生殖很有可能与 *Wolbachia* 的共生有关，因 *Wolbachia* 的影响而导致有性生殖世代的缺失。在瘿蜂族中，已证实有 7 种感染 *Wolbachia*(Abe and Miura, 2002; Rokas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2007)。然而，Rokas 等(2001, 2002)的研究显示一些感染 *Wolbachia* 的瘿蜂族种类，如 *Andricus solitarius*, *Biorhiza pallida* 和 *Callirhytis glandium*，仍有雄性个体的出现。Abe 和 Miura(2002)证实了 *Andricus mukaigawae*、Zhu 等(2007)证实了栗瘿蜂体内存在 *Wolbachia*，但 *Wolbachia* 的感染与宿主的产雌孤雌生殖并无关联。本研究采集的麦氏安瘿蜂 3 种群均获得了雌雄成虫，可见 *Wolbachia* 的共生并未诱导其营产雌孤雌生殖。

共生菌 *Wolbachia* 对节肢动物生殖最普遍的调控方式是诱导宿主的胞质不亲和(Stouthamer *et al.*, 1999)。当感染的雄虫(P^+)和未感染的雌虫(M^-)交配时，会造成父系染色体的丧失，使胚胎单倍体化。就双倍体物种来说会导致胚胎的死亡，但对于如膜翅目的雄性单倍雌性双倍体的物种来说，这些胚胎就发育成为雄性，此为单向胞质不亲和(unidirectional cytoplasmic incompatibility)(Stouthamer *et al.*, 1999)。很显然，由于 *Wolbachia* 是细胞质共生菌，因 *Wolbachia* 诱导的单向胞质不亲和而产生的单倍-双倍体物种的雄性个体应是不带菌的。此外，感染不同株系 *Wolbachia* 的雌、雄成虫之间存在双向胞质不亲和(bidirectional cytoplasmic incompatibility)现象(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999; Werren *et al.*, 2008)，其结

果甚至可能导致子代 100% 为雄性（Breeuwer and Werren，1990）。Dalla Torre 和 Kieffer（1910）对采集的麦氏安瘿蜂的虫瘿进行了解剖，获得的 8 头蜂全为雄性，并由此质疑其雌性可能形成形态不同的虫瘿。Weld（1952）亦报道采自汉口的麦氏安瘿蜂 6 头成虫中仅有 1 头雌性。我们采集的麦氏安瘿蜂岳阳、长沙及邵阳种群为其有性世代，既有雌性个体亦有雄性个体，但雄性比例均在 80% 以上，与历史记载相吻合。这种雄性比严重偏高的现象，无论是一般节肢动物（Werren，1997；Stouthamer *et al.*，1999；Werren *et al.*，2008），还是瘿蜂科昆虫（Plantard *et al.*，1998；Plantard *et al.*，1999；Rokas *et al.*，2002）均是不常见的。那么，麦氏安瘿蜂的这种雄性比显著偏高的现象是如何引起的？是否与其雌、雄虫均有较高感染率的 *Wolbachia* 有关（如诱导双向胞质不亲和）？这些都有待进一步探讨。

致谢　承蒙中南林业科技大学林学院喻勋林教授帮助鉴定植物种类，谨致谢意。

参考文献（References）

Abe Y, 1986. Taxonomic status of the *Andricus mukaigawae* complex and its speciation with geographic parthenogenesis (Hymenoptera: Cynipidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 21: 436－447.

Abe Y, Melika G, Stone G, 2007. The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the oriental and eastern Palearctic regions, and their associated communities. *Oriental Insects*, 41: 169－212.

Abe Y, Miura K, 2002. Does *Wolbachia* induce unisexuality in oak gall wasps? (Hymenoptera: Cynipidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95: 583－586.

Askew RR, 1984. The biology of gall wasps. In: Ananthakrishnan TN ed. The Biology of Galling Insects. IBH Publishing Co., New Delhi. 223－271.

Atkinson RJ, McVean GAT, Stone GN, 2002. Use of population genetic data to infer oviposition behaviour: species-specific patterns in four oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 383－390.

Bouwma AM, Ahrens ME, Deheer CJ, DeWayne Shoemaker D, 2006. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in introduced populations of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Insect Mol. Biol.*, 15: 89－93.

Braig HR, Zhou WG, Dobson SL, O'Neill SL, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.*, 180: 2373－2378.

Breeuwer JAJ, Werren JH, 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346: 558－560.

Dalla Torre KW von, Kieffer JJ, 1910. Cynipidae. In: Schulze FE ed. Das Tierreich. Ein Zusammenstellungund Kennzeichnung der rezenten Tierformen. Vol. 24. Lieferung Hymenoptera. R. Friedländer und Sohn. Berlin. xxxv＋891 pp.

Hebert PD, 1987. Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. *Exp. Suppl.*, 55: 175－218.

Hoy MA, Jeyaprakash A, Alvarez JM, Allsopp MH, 2003. *Wolbachia* is present in *Apis mellifera capensis*, *A. m. scutellata*, and their hybrid in Southern Africa. *Apidologie*, 34: 53－60.

Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9: 393－405.

Kieffer JJ, 1906. Description d. un genre nouveau et deux especes nouvelles. *Marcellia*, 5: 101－110.

Leach IM, van de Zande L, Bolhuis H, Beukeboom LW, 2004. No microbial endosymbionts associated with parthenogenesis in *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Proc. Exp. Appl. Entomol. Nev.*, 15: 119－122.

Liljeblad J, Ronquist F, 1998. A phylogenetic analysis of higher-level gall wasp relationships (Hymenoptera: Cynipidae). *Syst. Entomol.*, 23: 229－252.

Lo Verde V, van Lenteren JC, Smid HM, Jong PW, Carrillo CIC, Caleca V, 2008. External and internal elimination of supernumerary larvae in the whitefly parasitoid *Eretmocerus mundus* Mercet (Hymenoptera: Aphelinidae). *Biol. Control*, 46: 287－292.

Melika G, Abrahamson WG, 2002. Review of the world genera of oak cynipid wasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). In: Melika G, Thúroczy CS eds. Parasitic Wasps: Evolution, Systematics, Biodiversity and Biological Control. Agroinform, Budapest, Hungary. 150－190.

Ngi-Song AJ, Overholt WA, Stouthamer R, 1998. Suitability of *Busseola fusca* and *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) for the development of two populations of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. *Biol. Control*, 12: 208－217.

O'Neill SL, Pettigrew MM, Sinkins SP, Braig HR, Andreadis TG, Tesh RB, 1997. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol. Biol.*, 6: 33－39.

Pijls J, Steenbergen HJ, Alphen JJM, 1996. Asexuality cured: the relations and differences between sexual and asexual *Apoanagyrus diversicornis*. *Heredity*, 76: 506－513.

Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I, Solignac M, 1998. *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissimae* (Giraud) (Hymenoptera: Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 1075－1080.

Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I, Solignac M, 1999. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and 'Aylacini' (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol. Biol.*, 8: 185－191.

Pujade-Villar J, Bellido D, Seg G, 2001. Current state of knowledge of heterogony in Cynipidae (Hymenoptera: Cynipoidea). *Ses. Entom. ICHN-SCL*, 11: 87－107.

Rincon C, Bordat D, Lohr B, Dupas S, 2006. Reproductive isolation

and differentiation between five populations of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biol. Control*, 36: 171 – 182.

Rokas A, Atkinson RJ, Brown GS, West SA, Stone G, 2001. Understanding pattern of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *Heredity*, 87: 294 – 304.

Rokas A, Atkinson RJ, Nieves-Aldrey JL, West A, Stone G, 2002. The incidence and diversity of *Wolbachia* in gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) on oak. *Mol. Ecol.*, 11: 1815 – 1829.

Ronquist F, 1999a. Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zool. Scr.*, 28: 139 – 164.

Ronquist F, 1999b. Phylogeny of the Hymenoptera (Insecta): the state of the art. *Zool. Scr.*, 28: 3 – 11.

Stone GN, Cook JM, 1998. The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 979 – 988.

Stone GN, Schonrogge K, Atkinson RJ, Bellido D, Pujade-Villar J, 2002. The population biology of oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Ann. Rev. Entomol.*, 47: 633 – 668.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71 – 102.

Stouthamer R, Kazmer DJ, 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73: 317 – 327.

Suomalainen E, Anssi S, Lokki J, 1987. Cytology and Evolution in Parthenogenesis. CRC Press, Boca Raton, Florida. 216 pp.

Tang CT, Melika G, Yang MM, Nicholls JA, Csóka G, Stone GN, 2009. First record of an *Andricus* oak gallwasp from the oriental region: a new species from Taiwan (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). *Zootaxa*, 2175: 57 – 65.

Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M, 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.*, 16: 1711 – 1723.

Weinbauer MG, Rassoulzadegan F, Fereidoun, 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology*, 6: 1 – 11.

Weld LH, 1952. Cynipoidea (Hym.) 1905 – 1950. Privately published. Ann Arbor, Michigan. 351 pp.

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587 – 609.

Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 741 – 751.

Werren JH, Windsor DM, 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 1277 – 1285.

Werren JH, Windsor DM, Guo LR, 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 262: 197 – 204.

West SA, Cook JM, Werren JH, Coderay HCJ, 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol. Ecol.*, 7: 1457 – 1465.

Zhong M, Shen ZR, 2004. Infection of the endosymbiont *Wolbachia* in population of *Trichogramma evanescens* in China. *Acta Entomologica Sinica*, 47(6): 732 – 737. [钟敏，沈佐锐，2004. *Wolbachia* 在我国广赤眼蜂种群内的感染. 昆虫学报，47(6): 732 – 737]

Zhou W, Rousset F, O' Neil SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 509 – 515.

Zhu DH, He YY, Fan YS, Ma MY, Peng DL, 2007. Negative evidence of parthenogenesis induction by *Wolbachia* in a gallwasp species, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Entomol. Exp. Appl.*, 124: 279 – 284.

（责任编辑：袁德成）